

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-208528

(43)Date of publication of application : 30.08.1988

(51)Int.Cl.

A61K 35/74
A23K 1/16
// C12P 1/04
(C12P 1/04
C12R 1:01)

(21)Application number : 62-037759

(71)Applicant : AOYANAGI TOSHIO

(22)Date of filing : 23.02.1987

(72)Inventor : AOYANAGI TOSHIO

(54) PREVENTION OF NITRATE POISONING OF PLANT-EATING ANIMAL

(57)Abstract:

PURPOSE: To reduce methemoglobin concentration in blood of plant-eating animal and to prevent nitrate poisoning, by feeding denitrifying bacteria to plant-eating animals.

CONSTITUTION: Denitrifying bacteria (e.g. Rhodopseudomonas sphaeroides forma sp. denitrificans) belonging to the genus Rhodopseudomonas is fed to plant-eating animals such as cow, horse, pig, goat, etc. The bacteria are orally administered in the form of a culture solution and a dose of the culture solution is 500W1,000ml. A cell amount in 1,000ml culture solution is 3g by set weight and 1/5W1/6 the weight by dry weight. Nitrogen in the form of nitrate necessarily taken by eating grass is positively made harmless by administration of the bacteria, nitrate poisoning is prevented and plant-eating animals in the field of dairy farming can be maintained in a healthy state.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-208528

⑬ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和63年(1988)8月30日
 A 61 K 35/74 A E R 8615-4C
 A 23 K 1/16 3 0 4 B-6754-2B
 // C 12 P 1/04 Z-6807-4B
 (C 12 P 1/04
 C 12 R 1/01) 6712-4B 審査請求 有 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 草食動物の硝酸塩中毒予防方法

⑯ 特 願 昭62-37759

⑰ 出 願 昭62(1987)2月23日

⑱ 発 明 者 青 柳 敏 夫 埼玉県所沢市緑町3丁目12-15

⑲ 出 願 人 青 柳 敏 夫 埼玉県所沢市緑町3丁目12-15

⑳ 代 理 人 弁理士 佐々木 功

明 細 書

3. 発明の詳細な説明

1. 発明の名称

草食動物の硝酸塩中毒予防方法

2. 特許請求の範囲

(1) 脱窒バクテリアを草食動物に投与することを特徴とする、草食動物の硝酸塩中毒予防方法。

(2) 脱窒バクテリアがロードアソイドモナス属のバクテリアであることを特徴とする、特許請求の範囲第1項に記載の草食動物の硝酸塩中毒予防方法。

(3) 脱窒バクテリアがロードアソイドモナス・スファエロイデス・フォルマ・sp. デニトリフィカンスであることを特徴とする、特許請求の範囲第1又は2項に記載の草食動物の硝酸塩中毒予防方法。

(4) 脱窒バクテリアが、その培養液の形で経口投与されることを特徴とする、特許請求の範囲第1-3項の何れか1つに記載の草食動物の硝酸塩中毒予防方法。

(産業上の利用分野)

本発明は草食動物の硝酸塩中毒(メトヘモグロビン血症)予防方法に係り、畜産分野において草食動物の健康維持に利用することができる。

(従来の技術)

草食動物例えば牛、馬、豚、山羊等の飼育においては、餌として牧草、青刈飼料作物及びサイレージが汎く用いられているが、これらの内には多量の硝酸態窒素を含有しているものがある。硝酸態窒素を多量に含有している餌を常時与えていると硝酸塩中毒、即ち各種の代謝障害や所謂「ボックリ病」と称される突然死の発生し易いことが知られている。

即ち、例えば乳牛の場合に、哺乳された餌中に含有される硝酸態窒素はルーメン(第1胃)内のバクテリアであるマイクロフローラの作用により還元されて亜硝酸態窒素となり、次いで胃中及び血液中で還元され、最後にはアンモ

ニアに変化するものと考えられているが、これらの還元の際に放出される酸素が易酸化性ビタミンであるビタミン A、D、E、K 等のビタミン類を破壊してその欠乏症である繁殖障害、後産停滞、産前産後の起立不能、乳房炎、血乳等の代謝障害を発生し易くし、又出乳量の低下や増体量の低下の遠因となり、更に血中に吸収された亜硝酸態窒素は赤血球中の酸化ヘモグロビンと結合して酸素運搬能を有しないメトヘモグロビンとなり酸素欠乏状態をもたらして全身の機能を低下させ、この酸素欠乏状態が著しい場合には突然死であるボックリ病となり、又最終的に生成されるアンモニアは直接細胞を傷めるのみならず、解毒作用をもたらす肝臓に大きな負担を強いることになる。

牧草等が多量の硝酸態窒素を含有している理由は、その成長のために取り込んだ窒素を光合成に至るまで硝酸態窒素の形で主として茎部に、又一部は葉部に貯えておくためであり、例えば牧草に関連して言及すれば、その多量摂取

を目的として大量の窒素肥料が施与され、又多頭飼育による合理化及び糞尿投棄場の不足に基因して糞尿が牧草地に投棄され、その結果牧草地における窒素濃度が累積的に過多となるためである。このことは、牧草等がその生育のために形成した硝酸態窒素を、草食動物が牧草等の啃食により吸収し、その量が過大であると草食動物に硝酸塩中毒が発生することを意味しており、この因果関係が存在するために且つ又硝酸塩中毒の発生は既述のように酪農家に過大な経済的負担をもたらすために、その予防は酪農家にとって重大な関心事となっている。

硝酸塩中毒の発症は血中のメトヘモグロビン量を測定することにより大体の目安を得ることができる。メトヘモグロビン量が如何程になった場合に致死に至るかは個体差があり、又個体がその時に必要としている酸素要求量に依存するので明確ではないが、一般的には全ヘモグロビンの 50 - 90% がメトヘモグロビンになった時とされており、従ってメトヘモグロビン含量

50% が危険域への一応の閾値である〔稲崎「畜産の研究」第 29 巻第 3 号第 375 頁 (1975 年) 及び宮崎「畜産コンサルタント」第 141 号第 47 頁 (1976 年 9 月)〕。

しかしながら、従来行われてきた硝酸塩中毒の予防対策としては、牧草等の餌をサンプリングし硝酸態窒素を定量して硝酸態窒素量の少ないものを与えるか、硝酸態窒素量が高い場合にはこれに野草等の硝酸態窒素の少ないものを混じて全体としての硝酸態窒素摂取量を低下させるに過ぎなかった。例えばサイロに貯蔵されている餌の場合に、硝酸態窒素は水溶性であり底に溜っている水に溶存している場合が多いのでサイロの底部分にある餌を与える場合には硝酸態窒素の含有量を測定し、その量が高ければ水洗して与える等の方策が採用されており、具体的には次の対策が講じられる〔農林水産技術会議事務局編「実用技術レポート」第 34 号 (牛の硝酸塩中毒の発生要因と防除対策) 第 10 頁〕。

- a) 旱魃が続いた後に降雨があった場合には飼料作物における硝酸塩含量が高いので 3 - 5 日間はこのを与えるのを避ける、
- b) 硝酸塩含量が低下するまで刈取りや放牧を見合わせる、
- c) 硝酸塩含量の低い上部だけを与える、
- d) 採食速度が遅くなるように工夫する、
- e) 自由採食させず、1 - 2 週かけて供与量を漸増してゆく、
- f) 少なめに与える、
- g) 硝酸塩含量が高いものと推定される飼料作物を病氣中や虚弱動物に与えない、
- h) 硝酸塩含量が高いものと推定される飼料作物については時間的に間隔をおいて、例えば 24 時間間隔で与える、
- i) 硝酸塩含量が高いものと推定される飼料作物については硝酸塩含量の低い粗飼料と組合せて与える、
- j) 硝酸塩含量が高いものと推定される飼料作物については一度に大量に与えず、分

割して与える、

- k) 硝酸塩含量が高いものと推定される飼料作物については高エネルギー飼料と一緒に与える、
- l) 硝酸塩含量が高いものと推定される飼料作物についてはサイレージにして与える、
- m) 非蛋白態窒素の添加量を制限する、
- n) 硝酸塩含量が高いものと推定される飼料作物については沃素塩を添加して与える、
- o) 硝酸塩含量が高いものと推定される飼料作物についてはビタミン A を添加して与える、
- p) 飼料の急変を避け、青刈作物の供与時には尿素等を添加しない、
- q) 硝酸塩含量が高いものと推定される飼料作物の供与時には抗生物質の投与を避ける、

尚、硝酸塩中毒に起因するものと思われる症

らず、従って餌に起因する硝酸塩中毒の発生を確実に防止し得るものではないからである。

一方、硝酸塩中毒を治療するために従来採用されてきたメチレンブルーの静脈内投与は、メチレンブルーが本来塩基性染料であるために、殊に肉獣の場合には畜主がこれを避けたがる傾向を示す点に問題がある。即ち、メチレンブルーの投与を必要とする程に重い硝酸塩中毒の場合に当該動物は氣息奄奄の状態にあり、その投与によって当該動物の延命が必ずしも保証される訳ではなく、死ねば食肉として売却できず、一方その投与によって中毒死を免れたとしても肉に色が付き食肉としての価値が低下するために、生存状態にある間に屠殺場に搬入して食肉として売却するか、或はメチレンブルーの投与による治療に賭けるかは畜主が判断に迷う処からである。

従って、本発明の目的は草食動物における硝酸塩中毒の発生を積極的に防止する方法を提供することにあり、更に具体的に述べれば、牧草

状が現れた場合の対策としてはビタミン A や糖分の投与が有効とされているが、例えば糖分を投与すると一時的ではあるが血中メトヘモグロビン濃度の急上昇を招き、これが原因となって動物を致死に至らしめる場合があるので、現実的な対策としては 1% メチレンブルーの生理食塩水溶液の静脈内投与又はこのメチレンブルー投与とエビネフィリン投与との併用しかないのが実情である〔前出の宮崎「畜産コンサルタント」第141号第47頁(1976年9月)参照〕。

(発明の解決しようとする問題点及び発明の目的)

硝酸塩中毒を予防するために従来採用されてきた方策は何れも消極的なものである点に問題がある。藎し、牧草等に含有される硝酸態窒素と草食動物の硝酸塩中毒の間には言わば宿命的な因果関係が存在し且つ牧草等も有限な資源であって硝酸態窒素が皆無の、又はその含有量が極めて低いものを常に供給し得るものとは限

等の哺食により必然的に摂取される硝酸態窒素を積極的に無害化させることにより硝酸塩中毒を予防する方法を提供することにある。

(問題点を解決し、目的を達成する手段及び作用)

本発明によれば、脱窒バクテリアを草食動物に投与することにより上記の問題点が解決されると共に上記の目的が達成される。

脱窒バクテリアとしては種々のものが知られており、その内の幾つかの菌種は污水处理等に関して利用されているものがあるが、一般的に病原性を有しており、従って生体に関連して脱窒バクテリアを利用することは従来全く考えられて来なかった。

従って、本発明者は毒性が一般に低いとされる光合成バクテリアの利用に着目して研究を進めた処、ロードブソイドモナス (*Rhodo-pseudomonas*) 属のものが好ましく、殊にスファエロイデス (*sphaeroides*) 種のものであってロードブソイドモナス・スファエロイデス・フ

ホルマ・sp・デニトリフィカンス (*Rhodo-pseudomonas sphaeroides forma sp. denitrificans*) と命名されたもの (T. SATOH et al. "Arch. Microbiol." 108, 265 - 269 (1976)) が動植物に対して病原性を有さず且つ脱窒能を有しているために、草食動物の硝酸塩中毒の予防に利用し得ることを見出すに至ったのである。

本発明方法において脱窒バクテリアの投与は、その培養液の経口投与により行うことができる。培養液 1000ml 中の菌体量は湿潤重量で約 3g、乾燥重量ではその約 1/5 - 1/6 であり、投与量としては培養液量で 500 - 1000ml 程度で充分である。

尚、投与された脱窒バクテリアを定着させ得るか否かについては検討中であるが、対象動物における個体差もあって未だ明確なものとはなっていない。

(発明の効果)

本発明方法によれば、脱窒バクテリアを投与

草、ヘイキューブ等が適宜配合されて施与されるので、後者について常法により硝酸カリウムの含有量を調べた結果は下記の表 1 に示される通りであった。

表 1

試 料	水分 (%)	KNO ₃ 含有量 (%)	
		新鮮物	固形物
ビートバルブ	72.0	検出せず	検出せず
燕麦 (No. 1)	60.8	0.993	2.219
(No. 2)	65.2	1.326	3.809
コーンサイレージ	63.4	0.109	0.302

するだけで草食動物の血中メトヘモグロビン濃度を低下させることができ、延いては草食動物の硝酸塩中毒を予防することができる。従って、本発明方法はその実施が極めて容易であると言う利点を有している。

(実施例等)

次に、草食動物としてホルスタイン種の乳牛を選択し、その飲料水である井戸水に関してなされた水質試験、種々の餌に関してなされた硝酸塩含量の測定試験、脱窒バクテリアの培養試験及び脱窒バクテリアの投与試験に関連して本発明を更に詳細に説明する。

試験例 1 (井戸水の水質試験)

乳牛用の飲料水である井戸水の水質試験を常法により実施して亜硝酸態窒素及び硝酸態窒素の含有量を調べた結果、前者は検出されず、又後者の含量は僅かに 1.445ppm であった。

試験例 2 (餌における硝酸態窒素含量)

乳牛には配合飼料や藁の他にビートバルブ、燕麦、コーンサイレージ、スーダングラス乾

スーダングラス乾草	13.0	0.909	1.045
ヘイキューブ	13.0	0.386	0.444

試験例 3 (脱窒バクテリアの培養)

a) 前培養

保存培地に保存されている脱窒バクテリアであるロードアソイドモナス・スファエロイデス・フォルマ・sp・デニトリフィカンスを下記の液体培地に接種し、30℃ において約 3000 ルックスの光照射下に (60W 白熱電球の場合に光源から 5 - 10cm 程度離す) 嫌氣的に 3 日間静置培養する。

前培養用液体培地

酵母エキス	0.3%
カサミノ酸	0.2%
KNO ₃	0.2%
蒸留水	残部

b) 本培養

上記の前培養を終了した培養液を下記の本培養用液体培地に約 1 対 50 (容量比) の割合で接種し、前培養と同様の条件下に約 24 時間培養する。尚、この本培養の場合には嫌気条件を充分ならしめるために、前培養液と本培養培地にて培養フラスコを略完全に満たし、これによって培養フラスコの残スペースをなるべく小さくするのが好ましいが、培養の進行につれて窒素ガスが放出されるので余り厳密な配慮は不要なものと考えられた。

尚、得られた培養液の菌体量は培養液 1000 ml 当たり平均して湿潤重量で約 3g であり、乾重量ではその約 1/5 - 1/6 であった。

本培養用液体培地

バーサル塩溶液 (注 1)	100ml
マレイン酸ナトリウム	3g
ビタミン溶液 (注 2)	1ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g
KNO ₃	1g
酵母エキス	0.1g

蒸留水

残部

計 1 リットル

(注 3) 燐酸塩溶液の調製

KH ₂ PO ₄	40g に
K ₂ HPO ₄	60g

を添加し、次いで蒸留水を添加して全量を 1 リットルとした後に滅菌処理を施すことにより調製する。

(注 4) 痕跡元素溶液の組成

MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.1g
H ₃ BO ₃	2.8g
Cu(NO ₃) ₂ · 3H ₂ O	40.0mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	240.0mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	750.0mg
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	248.8mg
蒸留水	残部

計 1 リットル

実施例 (脱窒バクテリアの投与試験)

a) 試験期間

1986 年 12 月 2 日 - 12 月 18 日

上記の混合物を滅菌し、この滅菌混合物に燐酸塩溶液 (注 3) 15ml を添加し、次いで蒸留水を添加して全量を 1 リットルとなすことにより調製する。

(注 1) バーサル塩溶液の調製

MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.0g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.75g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	118.0mg 及び
EDTA (4H)	200.0mg

を蒸留水 800ml に溶解させて全量を 990ml になすと共に pH を 6.8 に調整し、次いで

痕跡元素溶液 (注 4) 10ml

を添加し、全量を 1 リットルとなすことにより調製する。

(注 2) ビタミン溶液の組成

ナイアシン	1g
チアミン塩酸塩	1g
ビオチン	0.04g

b) 実験動物

健康状態の良好なホルスタイン種の乳牛 3 頭を選択し、内 2 頭を被験動物とし、残 1 頭を対照動物として使用。

c) 飼料

被験動物、対照動物とも同質、同量の飼料を与えた。試験期間中に与えた一日当りの主な飼料は下記表 2 の通りであった。

表 2

期	昼	夜	量
フーズイレブ	-	-	8.0kg
ズビト燕麦	-	-	2.5kg
ハイキュー	ハイキュー	-	1.0kg x 2
-	スーダングラス	-	1.0kg
配合飼料	-	配合飼料	8.5kg/日
薬	薬	薬	4.0kg/日

d) 被験薬 (脱窒バクテリア)

前記の試験例 2 における本培養で得た培養液をその儘使用。

e) 被験薬の投与日、投与量及び投与方法

グロビン及び総ヘモグロビンを意味しており、又「採血日」の欄においてアンダーラインが付されている日は被験薬である脱窒バクテリア培養液の投与日であることを示している。

予め決められた日 (12 月 4 日、10 日、16 日及び 17 日) の朝飼料を与えてから 2 時間後に (12 月 16 及び 17 日には 1 時間後に)、被験動物 No.1 に対しては培養液 500 ml を、又 No.2 に対しては 1000ml を強制的に経口投与する。勿論、対照動物 (No.3) に対しては被験薬を投与しない。

f) 試験方法

被験動物については被験薬の投与から 2 時間後に (12 月 16 及び 17 日には 1 時間後に)、対照動物を含めて全頭から約 7ml の静脈血を真空採血管により採取し、冷凍保存し、次いで常法により総ヘモグロビン量及びメトヘモグロビン量を測定した。

g) 結果及び考察

結果は下記の表 3 に示される通りであり、動物による個体差もあるが被験薬である脱窒バクテリア培養液の投与により血中メトヘモグロビン量が有意に低下することが判明した (表中における MHB 及び THb はそれぞれメトヘモ

表 3

試験 区間	採血 日 12月 (日)	実験動 物番号 (No.)	MHB (g/dl)	THb (g/dl)	MHB/THb (%)	指 数	
						MHB (g/dl)	MHB (%)
第 1 回	2	1	0.916	8.98	10.20	94.5	94.5
		2	0.836	8.92	9.38	86.3	86.9
		3	0.969	8.98	10.79	100.0	100.0
	3	1	0.945	9.62	9.82	96.7	99.1
		2	0.918	9.41	9.76	94.0	98.5
		3	0.977	9.85	9.91	100.0	100.0
	4	1	0.817	10.38	7.87	113.2	115.2
		2	0.572	10.57	5.41	79.2	79.2
		3	0.722	10.57	6.83	100.0	100.0
第 2 回	9	1	1.047	9.41	14.95	115.6	132.1
		2	1.002	9.66	10.37	82.3	91.6
		3	1.217	10.75	11.32	100.0	100.0

特開昭63-208528(7)

第 2 回	10	1	0.572	9.33	6.13	51.2	64.0
		2	0.703	10.07	6.98	62.9	72.9
		3	1.118	11.67	9.58	100.0	100.0
	11	1	0.521	9.76	5.34	68.6	72.5
		2	0.451	10.64	4.24	59.4	57.5
		3	0.759	10.30	7.37	100.0	100.0
	第 3 回	15	1	1.455	10.46	13.91	145.8
			2	0.722	9.96	7.25	72.3
			3	0.998	11.09	9.00	100.0
		16	1	0.882	11.20	7.88	83.6
			2	0.841	10.30	8.17	79.7
			3	1.055	11.30	9.34	100.0
		17	1	0.788	10.30	7.65	91.9
			2	0.913	11.16	8.18	105.0
			3	0.865	11.26	7.68	100.0

第 3 回	18	1	0.619	10.08	6.14	109.9	117.9
		2	0.444	9.94	4.47	78.9	85.8
		3	0.563	10.80	5.21	100.0	100.0

特許出願人 齊 柳 敏 夫
代 理 人 井理士 佐々木 功

